

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication : 2 688 222

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 92 02510

(51) Int Cl⁵ : C 08 L 5/00, C 12 P 19/04, A 23 L 1/054, A 61 L 17/00(C 12 P 19/04, C 12 R 1:41)

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 03.03.92.

(71) Demandeur(s) : UNIVERSITE DE PICARDIE — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Courtois Josiane née Sambourg, Courtois Bernard, Heyraud Alain, Colin-Morel Philippe et Rinaudo Marguerite née Duhem.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 10.09.93 Bulletin 93/36.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(73) Titulaire(s) :

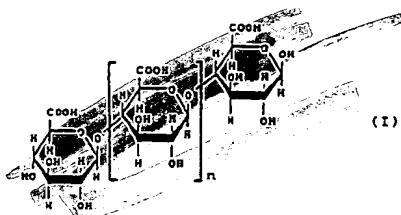
(74) Mandataire : S.A. Fedit-Loriot & Autres.

(54) Composés polymères de l'acide glucuronique, procédé de préparation et utilisation notamment en tant que moyens gélifiants, épaississants, hydratants, stabilisants, chélatants ou flocculants.

(57) La présente invention concerne en tant que produit industriel nouveau un composé polymère de l'acide glucuronique caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble constitué par

(a) les acides D-polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ de formule

maine alimentaire, pharmaceutique en thérapeutique humaine ou vétérinaire, cosmétique ou de l'épuration des eaux, en particulier en tant que moyen gélifiant, épaississant, hydratant, stabilisant, chélatant ou flocculant, et (ii) dans la préparation d'oligosaccharides.



, 102(b) 13, 14, 15 + 17

dans laquelle n est un nombre ayant une valeur moyenne comprise entre environ 300 et 2500,

- (b) les esters correspondants,
- (c) les éthers correspondants, et
- (d) leurs mélanges.

Elle concerne également le procédé de préparation de ce nouveau produit par fermentation, de préférence par fermentation de la souche Rhizobium meliloti NCIMB 40472.

Ce nouveau produit est utile notamment (i) dans le do-



1

***COMPOSES POLYMERES DE L'ACIDE GLUCURONIQUE, PROCEDE DE
PREPARATION ET UTILISATION NOTAMMENT EN TANT QUE MOYENS
GELIFIANTS, EPAISSISSANTS, HYDRATANTS, STABILISANTS,
CHELATANTS OU FLOCULANTS***

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention a trait, en tant que produits industriels nouveaux, à des composés polymères de l'acide glucuronique, à savoir les composés polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ de formule I ci-après. Elle concerne également le procédé de préparation de ces nouveaux composés ainsi que leur utilisation, notamment en tant que moyens gélifiants, épaississants, hydratants, stabilisants, chélatants, floculants, épurants et susceptibles de former des fibres, d'une part, et en tant que matériaux de départ pour la préparation de composés oligosaccharides, d'autre part.

Elle vise également en tant que nouveau produit industriel une souche bactérienne particulière appartenant à l'ensemble des *Rhizobium*, à savoir la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472, qui est utile dans la préparation desdits composés polymères de l'acide glucuronique par fermentation.

ART ANTERIEUR

Des polysaccharides, tels que les polymères de la présente invention, qui sont constitués exclusivement de motifs ou unités acide glucuronique à enchaînement $\beta(1-4)$, n'ont pas encore été décrits jusqu'à maintenant.

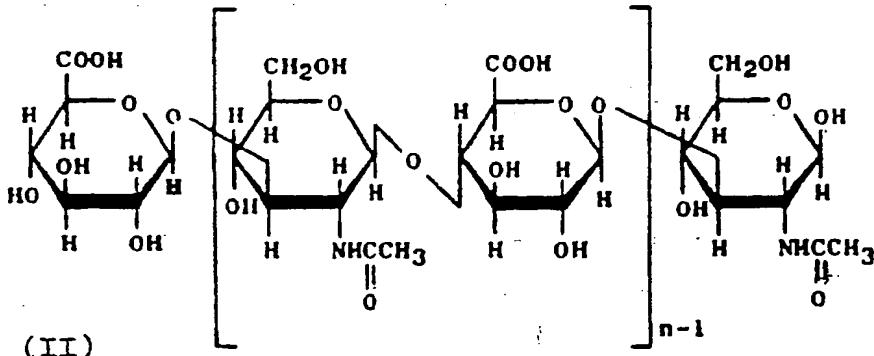
5 L'art antérieur le plus proche, connu du Titulaire de la présente invention comprend l'acide hyaluronique décrit notamment dans l'ouvrage *Merck Index*, 11^e édition, (1989), pages 751-752 (produit No 4675), d'une part, et
10 le polysaccharide décrit dans le document FR-A-2 378 092, d'autre part.

15 L'acide hyaluronique est un polysaccharide naturel constitué d'un motif répétitif à deux unités : une unité acide glucuronique et une unité glucosaminidique. Dans ce polysaccharide, ces deux unités sont alternées ; l'unité acide glucuronique présente un enchaînement $\beta(1-3)$ et l'unité glucosaminidique un à enchaînement $\beta(1-4)$. La formule développée de l'acide hyaluronique fournie dans le *Merck Index* précité est la suivante :

15

20

25



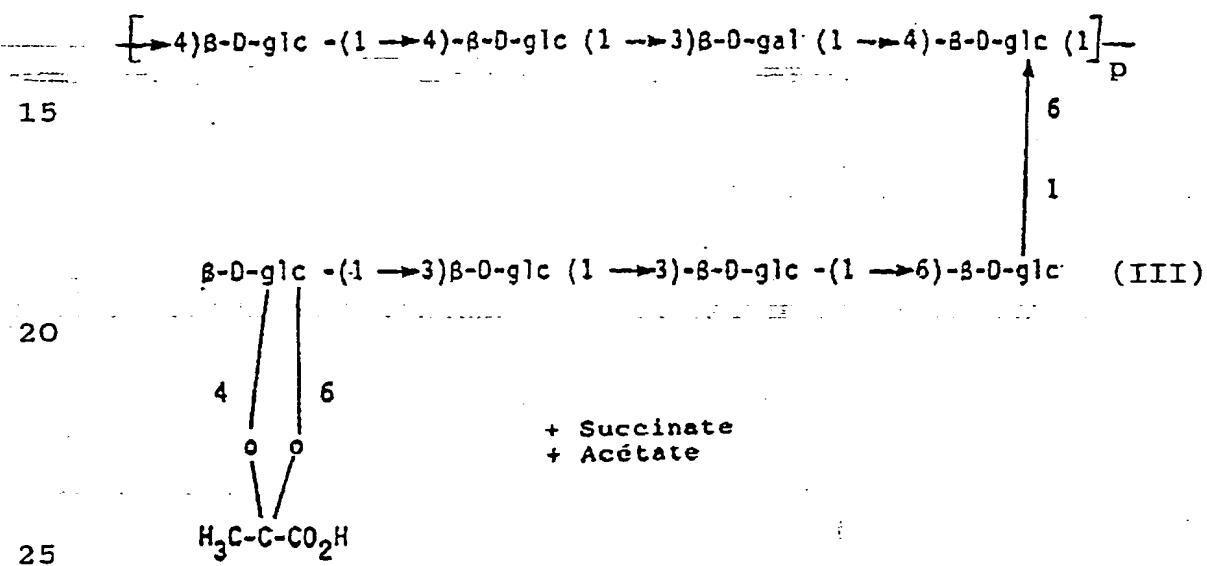
30

35

Le polysaccharide du document FR-A-2 378 092 est produit par voie exocellulaire à partir d'une souche de *Pseudomonas* NCIB 11264 (ATCC 31260) et comprend un motif répétitif constitué de 7 unités D-glucose (une unité de glucose substitué en position 6, deux unités de glucose disubstitué en position 4, deux unités de glucose substitué en position 3 et deux unités de glucose disubstitué en positions 4,6) et de 1 unité de D-galactose substitué en position 3, ce motif répétitif étant estérifié avec 1

unité acide acétique et 1 unité acide pyruvique, la chaîne latérale du polymère se terminant par une unité 4,6-O-(1-carboxyéthylidène)-D-glucose.

On sait par ailleurs que la souche sauvage
5 *Rhizobium meliloti* M5N1 (référence donnée par le Titulai-
re de la présente invention), isolée du sol, a été décri-
te par J. COURTOIS et al., *J. Bacteriol.*, (1988), 170,
pages 5925-5927. Dans les conditions de fermentation
10 données ci-après, cette souche produit des polysacchari-
des présentant des liaisons glycosidiques $\beta(1-3)$ et en
particulier le polymère répondant à la formule



qui a été déterminée par A. HEYRAUD et al., *Int.J. Macromol.*, (1986), 8, pages 55-88.

On sait enfin de l'article de G. De RUITER et al., *Carbohydrate Polymers*, (1992), 18, pages 1-7 que des composés polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ ont été isolés à partir de polysaccharides exocellulaires produits par des moisissures appartenant à l'ordre des mucorales. Ces composés polyglucuroniques, qui ont un M_w compris entre 5 500 et 10 000 daltons (i.e. un dp de 30 à 56 environ) selon les indications fournies dans le ta-

bleau I page 3 dudit article, sont en fait des oligosaccharides qui sont structurellement différents notamment par leur degré de polymérisation des polysaccharides selon l'invention. De plus, ledit article ne décrit ni ne 5 suggère les polysaccharides de dp moyen supérieur à 200, et en particulier de dp moyen supérieur ou égal à 300, selon l'invention. En particulier, il ne décrit ni ne suggère la présence ou l'obtention de polysaccharides exclusivement D-polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ 10 et de dp élevé, parmi les polysaccharides exocellulaires produits par les moisissures appartenant à l'ordre des mucorales et utilisés comme sources d'oligosaccharides de M_w allant de 5 500 à 10 000 daltons.

BUT DE L'INVENTION

15 Le but de l'invention est de fournir de nouveaux polysaccharides qui soient structurellement différents de l'acide hyaluronique précité et des autres polysaccharides de l'art antérieur, notamment les produits polymères mentionnés ci-dessus et les alginates, d'une part, et qui 20 soient industriellement utiles notamment en tant que moyens gélifiants, épaississants, hydratants, stabilisants, chélatants, flocculants, épurants et susceptibles de former des fibres, destinés notamment au domaine alimentaire, diététique, pharmaceutique (en thérapeutique 25 humaine ou vétérinaire), cosmétique, agricole, de l'épuration des eaux, des peintures, d'autre part.

On se propose également de fournir un procédé de préparation de ces nouveaux polysaccharides, qui sont des composés polymères de l'acide glucuronique à enchaînement 30 $\beta(1-4)$.

De plus, on se propose d'utiliser ces nouveaux polysaccharides en tant que source pour l'obtention de composés appartenant à l'ensemble des oligosaccharides.

Il existe en particulier un besoin en matériaux 35 polymères pour remplacer notamment l'acide hyaluronique

(principalement) et les alginates (à la rigueur). Pour satisfaire ce besoin, les chercheurs ont essayé de proposer des produits qui soient aussi intéressants que l'acide hyaluronique. Cet objectif particulier est atteint par la présente invention. Pour remplir ce but et fournir de nouveaux produits appartenant à l'ensemble des polysaccharides, on a recherché à mettre au point de nouveaux composés polymères de l'acide glucuronique qui soient utiles industriellement.

10

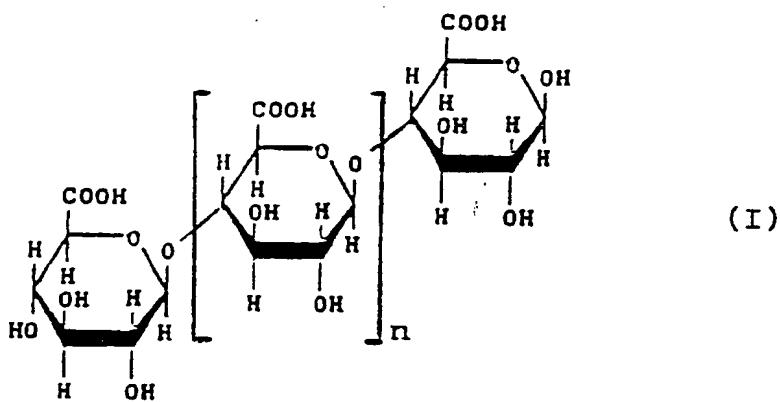
OBJET DE L'INVENTION

Selon un premier aspect de l'invention, on préconise un nouveau composé polymère de l'acide glucuronique caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble constitué par

(a) les acides D-polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ de formule

20

25



30

35

dans laquelle n est un nombre ayant une valeur moyenne comprise entre environ 300 et 2500,

(b) les esters correspondants,

(c) les éthers correspondants, et

(d) leurs mélanges.

Selon un second aspect de l'invention, on préconise un procédé de préparation d'un tel composé polymère de l'acide glucuronique.

Plus précisément, on vise ici un procédé de préparation d'un composé polymère d'acide glucuronique de formule I ou de l'un de ses esters dans lesquels les fonctions alcool OH sont partiellement O-acétylées, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend la fermentation, en présence d'un milieu nutritif contenant une source d'azote, une source de carbone et des sels, d'une souche bactérienne appartenant à l'ensemble des *Rhizobium* et produisant des polysaccharides quand elle est cultivée à pH 7 dans un milieu nutritif aqueux contenant 1 g/l de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/l de NH_4NO_3 et 10 g/l de glucose.

Selon un troisième aspect de l'invention, on vise en tant que produit industriel nouveau la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472 (référence donnée par le Titulaire de la présente invention : M5N1 CS) qui est obtenue par mutation de la souche sauvage M5N1 précitée.

Selon un quatrième aspect de l'invention, on préconise l'utilisation desdits composés polymères de l'acide glucuronique, notamment dans le domaine alimentaire, pharmaceutique (en thérapeutique humaine ou vétérinaire), cosmétique ou de l'épuration des eaux, en particulier en tant que moyens gélifiants, épaisseurs, hydratants, stabilisants, plastifiants, chélatants ou floculants, ou encore en tant que moyens filmogènes ou formant des fibres et des fibres.

Selon un cinquième aspect de l'invention, on préconise l'utilisation desdits composés dans la préparation d'oligosaccharides notamment utiles en agriculture.

ABREVIATIONS

Par commodité, les abréviations suivantes ont été utilisées dans le texte de la présente invention.

	Ac	= acétyle
	Bu	= n-butyle
	dp	= degré de polymérisation
	Et	= éthyle
5	Eto	= éthyloxy
	gal	= galactose
	glc	= glucose
	A.gluc	= acide glucuronique
	HPLC	= chromatographie liquide haute performance
10	iBu	= isobutyle
	iBuO	= isobutyloxy
	iPr	= isopropyle
	iPrO	= isopropyloxy
	M1	= milieu nutritif aqueux d'identification conte-
15		nant 1 g/l de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/l de NH_4NO_3 et 10 g/l de glucose et permettant de distinguer par culture à pH 7 les souches de <i>Rhizobium</i> qui produisent des PS de celles qui n'en produisent pas
20	M2	= milieu nutritif aqueux de production, préféré selon l'invention, contenant 1 g/l d'extrait de levure, 1 g/l de K_2HPO_4 , 0,2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et 10 g/l de glucose, fructose ou saccharose
	M5N1	= souche sauvage de <i>Rhizobium meliloti</i> décrite par J. COURTOIS et al., <i>J. Bacteriol.</i> , (1988), <u>170</u> , pages 5925-5927
25	M5N1 CS	= souche de <i>Rhizobium meliloti</i> selon l'invention, obtenue par mutation de la souche sauvage M5N1 et déposée auprès du NCIMB sous le No 40472
30	Me	= méthyle
	MeO	= méthyloxy
	Mw	= poids moléculaire moyen en poids
	NCIMB	= National Collection of Industrial and Marine Bacteria, (il s'agit d'un organisme britannique agréé pour le dépôt de souches)
35		

OS	= oligosaccharide
Pr	= n-propyle
PS	= polysaccharide
RT	= température ambiante (15-25°C)
5 sBu	= s.-butyle
sBuO	= s.-butyloxy
tBu	= t.-butyle
tBuO	= t.-butyloxy
Vi	= viscosité intrinsèque (ou η)

10 **DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION**

Les composés polymères de l'acide glucuronique selon l'invention comprennent donc les acides polyglucuroniques de formule I, leurs esters, leurs éthers et leurs mélanges.

15 Plus précisément, un tel composé polymère de l'acide glucuronique est choisi parmi l'ensemble constitué par

- les acides polyglucuroniques de formule I,
- les esters des acides polyglucuroniques de formule I
- 20 dans lesquels le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C₁-C₄,
- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste acyle aliphatique en C₂-C₄,
- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels (i) le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C₁-C₄, et (ii) l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste acyle aliphatique en C₂-C₄,
- les éthers des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste alkyle en C₁-C₄,

5 - les éther-esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels (i) le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C₁-C₄, et (ii) l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste alkyle en C₁-C₄, et
- leurs mélanges.

10 Les groupes alkoxy précités en C₁-C₄ peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes MeO, EtO, PrO, iPrO, BuO, iBuO, sBuO et tBuO.

15 Les groupes alkyle précités en C₁-C₄ peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes Me, Et, Pr, iPr, Bu, iBu, sBu et tBu.

20 Les groupes acyle aliphatiques en C₂-C₄ peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes Ac, COEt, COPr, COiPr.

25 Le produit préféré selon l'invention, a un \overline{M}_w de 80 000 à 400 000 daltons et est choisi parmi l'ensemble constitué par

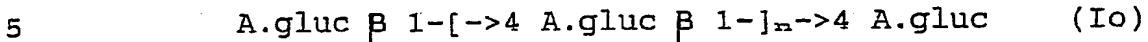
30 - les acides polyglucuroniques de formule I,
- les esters du type acétate correspondants dans lesquels les fonctions alcool OH sont partiellement O-acétylées, chaque cycle acide glucuronique de la formule I comportant au plus 33 % en poids de groupes O-CO-CH₃ (i.e. OAc) par rapport au poids dudit cycle acide glucuronique.

35 Dans ce dernier cas, la fonction acétyloxy est localisée soit en position 2, soit en position 3, soit encore en positions 2 et 3 du cycle acide glucuronique.

40 Bien entendu, il est possible d'éliminer ladite fonction acétyloxy. La désacétylation est réalisée à un pH supérieur à 8,0 à RT (le pH supérieur à 8,0 étant obtenu au moyen d'une base forte notamment un hydroxyde de métal alcalin comme NaOH ou KOH). Ainsi, 7-8 heures à RT et à pH 11 suffisent pour désacétyler le composé poly-

mère comportant jusqu'à 33 % en poids de groupe OAc par rapport au poids du cycle acide glucuronique.

Le polymère désacétylé qui répond à la formule I ci-dessus peut être représenté par la formule abrégée :



Les souches bactériennes, qui conviennent pour la mise en oeuvre du procédé de préparation selon l'invention, sont celles qui (i) appartiennent à l'ensemble des *Rhizobium* et (ii) produisent des PS quand elles sont 10 cultivées à pH 7 dans un milieu nutritif aqueux d'identification, à savoir le milieu M1 qui contient 1 g/l de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/l de NH_4NO_3 et 10 g/l de glucose.

15 Parmi les souches bactériennes qui conviennent, on peut notamment citer les souches de *Rhizobium meliloti* et les souches apparentées qui contiennent toutes un seul plasmide ayant un M_w d'environ 100 000 à 150 000 daltons. Parmi celles-ci, la souche préférée selon l'invention est la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472.

20 Le procédé de préparation d'un composé polymère de l'acide glucuronique, selon l'invention, comprend la fermentation en présence d'une source d'azote, d'une source de carbone et de sels, d'une souche bactérienne appartenant à l'ensemble des *Rhizobium* qui produisent des 25 PS par culture à pH 7 dans le milieu aqueux M1 précité.

30 Selon ce procédé, la production dudit composé polymère peut être soit intracellulaire soit le plus souvent exocellulaire. En pratique, pour une production exocellulaire, ladite fermentation est effectuée au moyen d'un milieu aqueux contenant 0,5 à 2 g/l de K_2HPO_4 , 0,05 à 0,3 g/l de $MgSO_4$, 0,8 à 3 g/l d'extrait de levure et 7 à 20 g/l de sucre, à une température de 25 à 40°C. Le

milieu nutritif peut contenir un sucre quelconque, le sucre préféré est notamment choisi parmi le glucose, le fructose, le saccharose et leurs mélanges.

Par incubation dans un tel milieu aqueux, pendant une durée appropriée (de préférence inférieure ou égale à 100 h ou à la rigueur supérieure à 100 h), les bactéries produisent (tant dans la phase de croissance que dans la phase stationnaire de non-prolifération), un composé polymère de l'acide D-glucuronique qui est le produit de formule I ou l'un de ses esters dans lequel les fonctions alcool OH sont partiellement O-acétylées. A partir de ce composé, on obtient les autres esters et/ou éthers selon une méthode connue en soi.

De préférence, pour l'obtention dudit composé polymère de l'acide glucuronique selon l'invention, le milieu aqueux de fermentation-incubation renfermera 1 g/l d'extrait de levure, 1 g/l de K_2HPO_4 , 0,2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (source de $MgSO_4$) et 10 g/l de sucre (de préférence glucose, fructose ou saccharose), à une température de 30°C, à un pH de 7 (obtenu par addition de NaOH ou KOH), avec pO_2 de 30 à 100 % (selon le degré d'acétylation souhaité).

De façon avantageuse, cette fermentation est mise en oeuvre à partir d'une population bactérienne supérieure ou égale à 10^2 bactéries/ml et mieux supérieure ou égale à 10^4 bactéries/ml. On recueille le milieu liquide de fermentation incubé pendant une durée inférieure ou égale à 100 h, qui contient le composé polymère polyglucuronique selon l'invention, dès que la population bactérienne est supérieure ou égale à 10^9 bactéries/ml. Dans cette optique, les bactéries sont séparées du milieu de fermentation notamment par filtration ou dialyse (en particulier sur membrane) ou encore par centrifugation afin de recueillir ledit composé polymère polyglucuronique contenu dans le jus de fermentation.

Ce composé polymère polyglucuronique est isolé du filtrat, dialysat ou surnageant résultant, soit par précipitation au moyen d'un solvant organique tel que ETOH, PrOH, iPrOH, MeCOMe ou un solvant analogue, soit par 5 précipitation en milieu acide à un pH inférieur ou égal à 3.

De façon avantageuse, quand le composé polymère polyglucuronique est obtenu par précipitation au moyen d'un solvant organique, on recommande d'opérer à basse 10 température, de préférence à une température de l'ordre de 4°C ; le précipité est alors recueilli par centrifugation puis séché (notamment sous vide à RT).

De façon également avantageuse, quand le composé polymère polyglucuronique est obtenu par précipitation en 15 milieu acide, il est recueilli par centrifugation, lavé à l'eau et dispersé sous agitation dans une solution aqueuse à pH supérieur ou égal à 8,0 pour être purifié ; le composé polymère polyglucuronique ainsi dissous en milieu alcalin est aussitôt reprécipité au moyen d'un solvant 20 organique comme indiqué ci-dessus.

A partir du polymère désacétylé, on peut former les esters de la fonction acide carboxylique COOH par alkylation selon une méthode connue en soi. On peut également obtenir les esters de la fonction alcool OH par 25 réaction du composé désacétylé de formule I avec un acide approprié selon une méthode connue en soi. Les éthers de la fonction alcool OH sont obtenus à partir dudit composé désacétylé par application d'un mécanisme réactionnel également connu en soi. Il en est de même pour les esters 30 des fonctions COOH et OH et les éther-esters.

Les composés polymères polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ selon l'invention, sont utiles dans plusieurs domaines, à savoir :

- l'industrie alimentaire tant humaine qu'animale, 35 notamment en tant qu'agents épaisseurs ou texturants ;

- l'industrie des papiers et cartons, notamment en tant qu'additifs ou moyens de couchage, voire même en tant que fibres ;
- 5 - l'industrie textile, notamment en tant qu'agents mordants et en tant que fibres ;
- l'industrie cosmétique, notamment en tant qu'agents épaississants, texturants, hydratants et/ou stabilisants ;
- 10 - l'industrie pharmaceutique (en thérapeutique humaine et vétérinaire, d'une part, en chirurgie, d'autre part, et en galénique, d'autre part), notamment en tant qu'agents de texture, d'enrobage, de stabilisation, de résorbage, en tant qu'additifs pour pansement ou peau artificielle ;
- l'industrie photographique, notamment en tant qu'agents filmogènes ;
- 15 - l'industrie des explosifs, notamment en tant qu'agents de dessiccation ou moyens plastifiants ;
- l'industrie des détergents et tensioactifs ;
- l'industrie des encres, peintures, vernis, laques, adhésifs et émaux, notamment en tant qu'additifs épaisseurs, texturants ou plastifiants ;
- 20 - l'industrie du traitement des métaux (en particulier pour le décapage) et celle du traitement des eaux, notamment en tant qu'agents chélatants ou floculants ;
- l'industrie des forages, notamment en tant qu'additifs pour boues de forage ;
- 25 - l'agriculture, notamment en tant que support d'enrobage ;
- l'immobilisation de cellules et en tant que support de culture.

30 Les composés polyglucuroniques, selon l'invention, se sont révélés particulièrement utiles industriellement en remplacement de l'acide hyaluronique dans les domaines où ledit acide hyaluronique est intervenu jusqu'à présent.

Les composés polyglucuroniques, selon l'invention, sont plus précisément très efficaces en thérapeutique humaine et vétérinaire, d'une part, et en chirurgie, d'autre part, en raison de leur aptitude à former des fibres et des fils ou filés. En particulier, les fils en polymère polyglucuronique selon l'invention conviennent parfaitement pour la réalisation de points de suture, ils ont une structure éliminable par biodégradation ou traitement à l'eau. De ce fait, ils présentent une grande analogie avec les fils constitués d'acide hyaluronique et sont très intéressants dans le domaine de la viscochirurgie.

Les fibres et fils polyglucuroniques sont également très performants dans le domaine papetier et le domaine textile.

Les composés polyglucuroniques, selon l'invention, sont également utiles dans le domaine de la préparation d'oligosaccharides D-polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$. Plus précisément, les OS sont obtenus par hydrolyse notamment acide ou enzymatique desdits composés polymères D-polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$.

Cette hydrolyse peut être réalisée, soit (i) en présence des bactéries *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472, en continuant la fermentation dans le milieu M2 pendant plus de 100 h, soit (ii) par incubation des composés polymères polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ ou du jus de fermentation les contenant pendant plus de 100 h à une température de 20-40°C, soit (iii) par clivage enzymatique notamment au moyen d'une cellulase, soit encore (iv) par clivage en milieu acide à pH inférieur ou égal à 3, pendant au moins 90 h à 100°C.

Les OS ainsi obtenus puis séchés ont, après isolation, un ~~rapport variable~~ de 2 à 10 pour les OS à chaîne courte, de 10 à 50 pour les OS de taille moyenne, et de 50 à 100 environ pour ceux ayant une chaîne longue. Les

OS préférés selon l'invention ont un dp compris entre 5 et 20.

Ces OS qui comportent des unités d'acide glucuronique sont en particulier utiles dans le domaine de l'agriculture, eu égard à leurs effets bénéfiques sur :

5 - les cultures végétales *in vitro*,

- les croissances racinaires (notamment la formation de poils absorbants),

- l'induction d'un système de défense chez les plantes 10 vis-à-vis des bactéries, moisissures, virus et autres agents cliniques extérieurs, et

- la protection des semences, en tant qu'additifs pour enrobage.

15 Ces OS sont également utiles dans le domaine pharmaceutique, en thérapeutique humaine et vétérinaire ou dans le domaine du diagnostic, notamment en tant que moyen de ciblage d'ingrédients actifs.

MEILLEUR MODE

Le meilleur mode de mise en oeuvre de l'invention 20 consiste à fournir un acide polyglucuronique de formule I ayant un M_w de l'ordre de 80 000 à 400 000 daltons. Cet acide polyglucuronique est obtenu à partir de la souche bactérienne *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472.

De façon pratique, on procède à l'ensemencement 25 d'un milieu nutritif aqueux contenant 1 g/l d'extrait de levure, 1 g/l de K_2HPO_4 , 0,2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et 10 g/l de glucose, fructose ou saccharose (i.e. le milieu M2 précité), à une température de 30°C, à un pH de 7, avec pO_2 de 30 à 100 % au moyen de ladite souche *Rhizobium* 30 *meliloti* NCIMB 40472 de façon à avoir dans le milieu de fermentation de départ pour cette souche une population bactérienne d'au moins 10^4 bactéries/ml. La fermentation est effectuée jusqu'à ce que l'on obtienne une population bactérienne d'au moins 10^9 bactéries/ml (elle peut être 35 poursuivie selon la production souhaitée). On sépare les bactéries du milieu de fermentation par filtration tan-

gentielle sur un filtre ou une membrane filtrante de 200 nm de porosité. Le filtrat qui contient l'acide polyglucuronique éventuellement acétylé est traité avec EtoH, iPrOH ou MeCOME à 4°C. Le précipité ainsi obtenu est recueilli par filtration puis séché. Le polymère, ainsi obtenu, remis en solution peut être ensuite désacétylé à pH 11, pendant au moins 7 h et au plus 24 h à RT.

En pratique, la durée totale de fermentation-
10 incubation du milieu nutritif (milieu M2 ou milieu analogue contenant un sucre différent du glucose, du fructose et du saccharose) avec la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472 pour la production des polysaccharides de formule I et de leurs esters correspondants (dans lesquels la fonction alcool OH est partiellement acétylée) est inférieure égale ou supérieure à 100 h, à 30°C et à pH 7. Cette production est réalisée (a) pendant la phase de croissance de la souche, et/ou (b) pendant la phase de non-prolifération de celle-ci après que la population bactérienne ait atteint au moins la valeur de 10⁹ bactéries/ml. Quand la durée est nettement inférieure à 100 h, on favorise la production des PS de l'invention ayant un \bar{M}_w se situant dans la partie haute de l'intervalle 80 000-400 000 daltons ; quand la durée est supérieure à 100 h, on favorise la production des PS ayant un \bar{M}_w se situant dans la partie basse de cet intervalle, et des OS.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture d'exemples de préparation et de résultats d'essais qui suivent. Bien entendu, l'ensemble de ces éléments n'est nullement limitatif mais donné à titre d'illustration.

PREPARATION I

Obtention de la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472
35 a) Mutation

On procède à la mutation de la souche sauvage

M5N1 précitée au moyen de N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

b) Sélection

Le mélange des bactéries vivantes obtenues après mutation estensemencé sur le milieu M1. Ce milieu sert à éliminer les bactéries jugées ici non intéressantes selon un caractère d'auxotrophie. Le glucose contenu dans M1 remplit deux fonctions : il intervient en tant que source de carbone, d'une part, et il permet de distinguer les bactéries mutées ou non-mutées, qui ne produisent pas de PS, des bactéries mutées produisant des PS en présence dudit glucose.

Les colonies produisant des PS sont cultivées sur milieu au bleu d'aniline. Le milieu au bleu d'aniline permet de distinguer les souches, qui répondent positivement au milieu et ont des liaisons glycosidiques $\beta(1-3)$, des souches répondant négativement que l'on recueille.

Les souches ainsi recueillies sont analysées quant à leur contenu en DNA extrachromosomique (i.e. leur contenu plasmidique). On applique le protocole de lyse directe mis au point par T.ECKHARDT, *Plasmid*, (1978), 1, pages 584-588, sur lesdites souches.

Les profils plasmidiques desdites souches sont comparés à celui de la souche sauvage M5N1 de départ, afin de repérer et de ne retenir que les souches présentant un contenu plasmidique modifié. On a ainsi retenu une souche, qui ne comporte qu'un seul plasmide de M_w compris entre 100 000 et 150 000 daltons, et qui ne comporte plus les plasmides constitutifs de la souche M5N1, à savoir : 2 plasmides de M_w = 1 000 000 daltons et 1 plasmide de M_w = 90 000 daltons.

Cette souche ainsi sélectionnée a été (i) contrôlée en ce qui concerne son pouvoir d'infectivité vis-à-vis de la luzerne (légumineuse spécifique de *Rhizobium meliloti* ; la réponse à l'infection étant positive puisque des nodules sont apparus sur des racines de luzerne),

puis (ii) déposée auprès d'un organisme agréé. Cette souche est référencée NCIMB 40472.

PREPARATION II

Fermentation en condition de croissance

5 Dans un fermenteur de 20 litres contenant 15 litres de milieu M2, on introduit l'inoculum de la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472 [l'inoculum est constitué ici par 1 litre de M2 (en fiole d'Erlenmeyer) contenant la souche NCIMB 40472]. L'inoculum est utilisé quand la 10 suspension bactérienne est de l'ordre de 10⁹ bactéries/ml. La fermentation est effectuée avec les paramètres suivants :

température 30°C
pH maintenu à 7 (addition de KOH 1M ou plus)
15 pO₂ 30 à 100 % (selon le degré d'acétylation souhaité)
agitation 100 t/min

20 A l'issue du processus de fermentation, le milieu peut contenir 1 à 5 g.l⁻¹.jour⁻¹ de polymère polyglucuronique à enchaînement $\beta(1-4)$ selon l'invention. Le rendement par rapport au sucre du milieu M2 varie ainsi entre 20 et 85 % (les mesures sont effectuées en chromatographie HPLC avec une colonne Beckman TSK 2000 SW et détection par réfractométrie).

PREPARATION III

Fermentation en condition de non-prolifération

Les cellules sont cultivées dans les conditions (inoculum/milieu) décrites dans la préparation II ci-dessus. Lorsque la suspension dans le fermenteur atteint 10⁹ bactéries/ml de *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472, on fait passer le milieu de fermentation au travers de membranes de microfiltration (200 nm de porosité), les cellules sont lavées et récupérées (elles peuvent être récupérées directement par centrifugation en continu dans des conditions stériles).

35 Ces cellules sont lavées au moyen d'un milieu exempt d'azote comprenant :

K_2HPO_4 ,	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$,	0,2 g
H_2O	qsp 1 l

et introduites ensuite dans un fermenteur contenant 15
5 litres de milieu dépourvu d'azote mais additionné de 10 g/l de glucose, fructose ou saccharose.

Le fermenteur ainsi inoculé à une concentration bactérienne d'environ 10^9 bactéries/ml est soumis aux mêmes paramètres que dans le cas d'une production en
10 croissance.

A l'issue de la fermentation, le milieu contient le même polymère que celui de la préparation II à une concentration analogue à celle de la fermentation en croissance.

15 **PREPARATION IV**

Fermentation en continu

Le protocole opératoire est le même que selon la production en croissance. En cours de production, on préleve un volume de milieu qui est soumis en continu à une
20 microfiltration, le filtrat contenant le polymère polyglucuronique à enchaînement $\beta(1-4)$ est récupéré, les bactéries pouvant le cas échéant être recyclées dans le fermenteur avec un milieu de fermentation stérile correspondant à celui qui a été sous-tiré.

25 **PREPARATION V Isolation du polymère**

(a) Les bactéries sont éliminées du milieu de fermentation par filtration (en particulier filtration tangentielle sur filtre de 200 nm de porosité, notamment filtre MICROSART MINI commercialisé par la société SARTORIUS) ou
30 par centrifugation du milieu de fermentation de la préparation II, III ou IV.

(b) Le composé polyglucuronique à enchaînement $\beta(1-4)$ est récupéré du filtrat ou du surnageant par précipitation avec un solvant organique tel que EtOH, iPrOH ou
35 MeCOMe. Quand on utilise iPrOH, ce solvant est ajouté au

filtrat selon une proportion de 70 % v/v, le cas échéant en présence de NaCl 1M. On homogénéise l'ensemble résultant et il se forme un précipité de composé polyglucuronique (la précipitation est favorisée à basse température, notamment à + 4°C). Le précipité est recueilli par centrifugation et séché sous vide à RT.

5 **PREPARATION VI**

Isolation du polymère

Après l'étape (a) de la préparation V, on procède 10 à la précipitation selon les modalités suivantes.

(b) La précipitation est réalisée en milieu acide (on peut utiliser HCl) et intervient à un pH voisin de 3. Le précipité obtenu est récupéré par centrifugation, lavé à l'eau puis dispersé sous agitation dans une solution 15 aqueuse à pH 8 ; le polymère se redissout, il est récupéré par filtration avec un solvant organique comme indiqué à l'étape (b) de la préparation V, ou directement par séchage ou déshydratation.

10 **PREPARATION VII Isolation du polymère**

Le composé polyglucuronique à enchaînement β (1-4) isolé selon les modalités des préparations V et VI étant peu purifié, l'on recommande d'utiliser les conditions opératoires qui suivent pour obtenir un produit hautement purifié.

25 Le filtrat ou surnageant obtenu selon l'étape (a) de la préparation V est purifié par ultrafiltration tangentielle avec une membrane dont la porosité est comprise entre 60 000 et 80 000 daltons. Pour purifier le concentrat, on écarte le filtrat et l'on remplace par de l'eau 30 distillée. Cette opération est répétée jusqu'à ce que la purification désirée soit atteinte. Le polymère polyglucuronique à enchaînement β (1-4) est isolé par évaporation sous vide à RT.

PREPARATION VIII

35 Désacétylation

Le polymère isolé, obtenu selon la préparation VII qui contient au plus 33 % en poids de groupe OAc par rapport au poids de l'unité répétitive acide glucuronique est traité à un pH supérieur à 8 au moyen de NaOH. Une 5 nuit à RT et à pH 11 permet de désacétyler la molécule.

ANALYSES

(a) Les analyses effectuées sur les produits polymères obtenus selon les préparations V-VII, d'une part, et 10 la préparation VIII, d'autre part, ont permis de mettre en évidence que :

1°) les produits des préparations V-VIII sont des composés polymères D-polyglucuroniques exclusivement constitués d'unités acide D-glucuronique, et présentant un enchaînement $\beta(1-4)$;
15 2°) les produits des préparations V-VII sont des composés polymères de l'acide D-glucuronique partiellement acétylés (au plus 33 % en poids comme indiqué ci-dessus) en position 2, en position 3 ou en positions 2 et 3 ;
3°) le produit de la préparation VIII est désacétylé.

20 (b) En ce qui concerne la stabilité, on constate que les solutions du composé polyglucuronique selon les préparations V-VIII sont stables à froid en milieu alcalin, notamment à pH 11 ; si la température s'élève, les substituants OAc sont clivés. Ce composé polyglucuronique 25 est également stable en milieu acide mais précipite à un pH de l'ordre de 3.

(c) En ce qui concerne la viscosité, on constate que 30 la viscosité intrinsèque (η_i) dans NaCl 0,1 M est de 650 ml/g pour un M_w de 150 000 (le M_w peut varier en fonction de la durée de fermentation entre 80 000 et 400 000 daltons et mieux entre 100 000 et 350 000 daltons). Cette viscosité intrinsèque est faible par comparaison avec celle du succinoglycanne produit par la souche sauvage

Rhizobium meliloti M5N1 qui a une Vi de 5480 ml/g pour un M_w de 4 000 000 daltons. Les résultats obtenus en ce qui concerne cette viscosité intrinsèque sont comparables à ceux d'un alginate ayant un M_w de 270 000 daltons.

5 Les solutions de composés polymères polyglucuroniques selon l'invention ayant un M_w supérieur à 300 000 daltons à des concentrations de 20 à 30 g/l forment quelques minutes après leur homogénéisation des gels fermes thermoréversibles.

10 Aux mêmes concentrations dans l'eau, le polymère selon l'invention ayant un M_w de l'ordre de 80 000 daltons, donne quelques minutes après son homogénéisation un gel souple. Aux concentrations plus faibles, les solutions des polymères selon l'invention se comportent comme 15 des épaississants.

(d) Interaction avec les ions monovalents

Les ions monovalents forment des gels avec les 20 solutions des polymères polyglucuroniques selon l'invention. Ces gels sont thermoréversibles. La formation du gel dépend de la nature du cation, de la force ionique et de la concentration, la sélectivité ionique étant la suivante : $Na^+ < Li^+ < K^+ < NH_4^+$.

25 Avec NH_4^+ , on observe une transition conformati-
tionnelle : la température de transition dépend de la concentration en NH_4^+ (NH_4Cl de 0,5 M à 1,5 M ou plus) et du taux d'acétate dans la molécule.

30 Le gel, formé avec NH_4Cl 0,5 M et le composé polyglucuronique selon l'invention à une concentration de 10 à 15 g/l, portée à 100°C pendant 24 h n'est pratiquement pas dégradé.

(e) Interaction avec les ions divalents

En association avec des ions métalliques diva-
lents notamment ceux des calcium, baryum, strontium, magnésium, zinc et cuivre divalent, des gels sont formés.

35 Avec l'ion calcium, le polysaccharide forme un gel qui

est comparable à ceux des acides pectiniques (substances du type acide polygalacturonique) et des alginates (substances du type copolymère acide mannuronique/acide guluronique). Contrairement aux acides pectiniques et 5 alginiques, le composé polymère polyglucuronique selon l'invention, en solution dans l'eau et mis en présence de $MgCl_2$ est capable de former un gel thermoréversible.

Les gels peuvent être formés directement au contact de Ca^{2+} et des composés polymères polyglucuroniques 10 à enchaînement $\beta(1-4)$ par dialyse ou toute autre méthode permettant un contact progressif entre l'ion et lesdits composés polymères. En particulier, ces gels peuvent être formés en utilisant des réactifs permettant une gélification progressive : il est ainsi possible de former un gel 15 à partir d'un composé polymère à 10 g/l dans l'eau et de $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ (à la concentration de 1,2 à 1,5 g/l) et de gluconolactone (à la concentration de 4,5 g/l), après homogénéisation, le gel se forme dans la préparation maintenue immobile.

20 Des gels fermes peuvent être obtenus à partir de concentrations en composé polymère polyglucuronique selon l'invention de l'ordre de 3 g/l.

En ce qui concerne la stabilité des gels déterminée à partir de solutions aqueuses de composé polymère 25 polyglucuronique selon l'invention en présence de Ca, on a constaté ce qui suit :

à 100°C

- dans l'eau, le gel porté à une température de 100°C pendant 1,5 h ne subit pas de modification, la force du gel (module) est inchangée après 24 h (mesure de compression effectuée sur appareil INSTRÖN),
- dans HCl, le gel placé à 100°C à des pH inférieurs à 2 est stable pendant au moins 1 h,
- dans NaOH, le gel placé à 100°C à des pH de 8-13 est 35 stable pendant au moins 1 h,

ble en trois fractions de dp 5-10, 10-50 et 50-60.

PREPARATION XI

Obtention d'un composé oligosaccharide

La présente préparation illustre l'obtention d'OS
5 par hydrolyse enzymatique.

(a) On soumet le composé polymère polyglucuronique à
enchaînement $\beta(1-4)$ obtenu selon les modalités opératoires
10 décrites dans la préparation V, VI ou VII, à une dégradat-
ion enzymatique au moyen d'une cellulase.

10 (b) L'isolation du composé OS ainsi obtenu est effec-
tuée comme indiqué à l'étape (b) de la préparation IX.
Après ultrafiltration, purification puis séchage, on ob-
tient un OS ayant un dp de 5-60 séparable en trois frac-
tions de dp 5-10, 10-50 et 50-60.

15 **PREPARATION XII**

Obtention d'un composé oligosaccharide

La présente préparation illustre l'obtention d'OS
par hydrolyse acide.

(a) On soumet le composé polymère polyglucuronique à
enchaînement $\beta(1-4)$ obtenu selon les modalités opératoires
20 décrites dans la préparation V, VI ou VII, à une hy-
drolyse acide pendant 96 h à pH 3 au moyen de HCl.

(b) L'isolation du composé OS ainsi obtenu est effec-
tuée comme indiqué à l'étape (b) de la préparation IX.
25 Après ultrafiltration, purification puis séchage, on ob-
tient un OS ayant un dp de 5-60 séparable en trois frac-
tions de dp 5-10, 10-50 et 50-60.

Les OS des trois fractions obtenues suivant les
30 préparations IX-XII peuvent être isolés par chromatogra-
phie du type gel-filtration ou par toute autre méthode
permettant de séparer les molécules en fonction de leur
taille et/ou de leur masse.

PREPARATION XIII

Obtention de l'acide glucuronique

35 L'acide polyglucuronique de formule I obtenu par

désacétylation selon les modalités opératoires décrites dans la préparation VIII a été soumis à une hydrolyse enzymatique poussée de façon à fournir l'acide glucuronique.

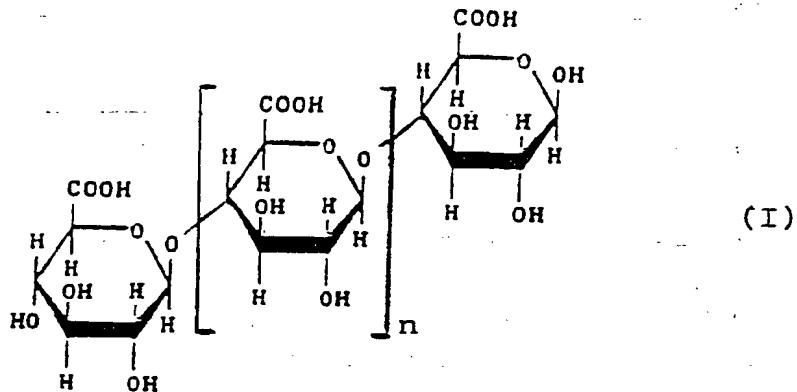
5 L'acide glucuronique ainsi formé peut être isolé par ultrafiltration et purifié par chromatographie d'échanges d'ions, par électrodialyse ou toute autre méthode appropriée permettant de séparer ledit acide des molécules plus grandes et des sels présents dans le
10 milieu d'hydrolyse enzymatique.

REVENDICATIONS

1. Composé polymère de l'acide glucuronique caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble constitué par

5 (a) les acides D-polyglucuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ de formule

10



15

dans laquelle n est un nombre ayant une valeur moyenne comprise entre environ 300 et 2500,

(b) les esters correspondants,

(c) les éthers correspondants, et

20

(d) leurs mélanges.

2. Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble constitué par

25

- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C_1-C_4 ,

30

- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste acyle aliphatique en C_2-C_4 ,

- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels (i) le reste OH d'au moins un groupe acide

carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C₁-C₄, et (ii) l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste acyle aliphatique en C₂-C₄,

5 - les éthers des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste alkyle en C₁-C₄,

- les éther-esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels (i) le reste OH d'au moins un 10 groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C₁-C₄, et (ii) l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste alkyle en C₁-C₄, et

- leurs mélanges.

15 3. Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il a un poids moléculaire moyen en poids de 80 000 à 400 000 daltons et est choisi parmi l'ensemble constitué par

20 - les acides polyglucuroniques de formule I selon la revendication 1,

- les esters acétate correspondants dans lesquels les fonctions alcool OH sont partiellement O-acétylées, chaque cycle acide glucuronique de la formule I comportant au plus 33 % en poids de groupes O-CO-CH₃ par rapport au 25 poids dudit cycle acide glucuronique.

4. Procédé de préparation d'un composé polymère d'acide glucuronique de formule I selon la revendication 1 ou de l'un de ses esters dans lesquels les fonctions alcool OH sont partiellement O-acétylées, ledit procédé 30 étant caractérisé en ce qu'il comprend la fermentation, en présence d'un milieu nutritif contenant une source d'azote, une source de carbone et des sels, d'une souche bactérienne appartenant à l'ensemble des *Rhizobium* et produisant des polysaccharides quand elle est cultivée à 35 pH 7 dans un milieu nutritif aqueux contenant 1 g/l de

K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/l de NH_4NO_3 et 10 g/l de glucose.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que ladite souche contient un seul plasmide ayant un poids moléculaire moyen en poids d'environ 100 000 à 150 000 daltons.

6. Procédé suivant la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce qu'il comprend la fermentation de la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472.

10 7. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que la fermentation est effectuée dans un milieu aqueux contenant 0,5 à 2 g/l de K_2HPO_4 , 0,05 à 0,3 g/l de $MgSO_4$, 0,8 à 3 g/l d'extrait de levure et 7 à 20 g/l de sucre, à une température de 25 à 15 40°C, ledit sucre étant notamment choisi parmi le glucose, le fructose, le saccharose et leurs mélanges.

8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend (i) le recueil du milieu de fermentation incubé pendant une 20 durée appropriée, après que la population bactérienne ait atteint une valeur supérieure ou égale à 10⁹ bactéries/ml, puis (ii) l'isolation du composé polymère de l'acide glucuronique.

9. Souche bactérienne appartenant à l'ensemble des 25 *Rhizobium*, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472.

10. Utilisation du composé polymère de l'acide glucuronique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, notamment dans le domaine alimentaire, pharmaceutique en 30 thérapeutique humaine ou vétérinaire, cosmétique ou de l'épuration des eaux, en particulier en tant que moyen gélifiant, épaisissant, hydratant, stabilisant, chélant ou flocculant.

11. Utilisation du composé polymère de l'acide glucuronique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3,

pour la fabrication de fibres ou fils polyglucuroniques.

12. Utilisation du composé polymère de l'acide glucuronique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans la préparation de composés oligosaccharides D-polyglucuroniques à enchainement $\beta(1-4)$.

13. Composé oligosaccharide, caractérisé en ce qu'il est obtenu par hydrolyse, notamment acide ou enzymatique, d'un composé polymère de l'acide glucuronique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, et en ce qu'il a un degré de polymérisation notamment compris entre 2 et 100 et de préférence compris entre 5 et 20.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9202510
FA 469066

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US-A-2 232 990 (EDWARD C. YACKEL ET AL.) * page 3, ligne 18 - ligne 19 * ---	1	
A	CARBOHYDRATE POLYMERS. vol. 18, no. 1, BARKING GB pages 1 - 7 GERHARD A. DE RUITER ET AL. 'ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BETA(1-4)-D-GLUCURONANS FROM EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES OF MOULDS BELONGING TO MUCORALES' -----		
1			C12P C08B
		Date d'achèvement de la recherche 30 NOVEMBRE 1992	Examinateur LESEN H.W.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

